



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

REC'D 01 MAR 2004

WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: Invenzione Industrial

N. RM2003 A 000053

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



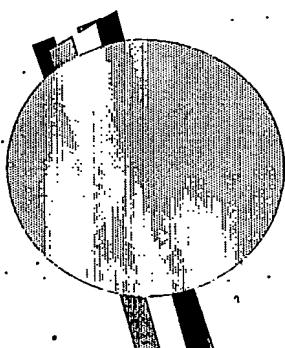
29 DIC. 2003

Roma, il

per IL DIRIGENTE

Paola Giuliano

Dr.ssa Paola Giuliano



PROSPETTO A

RIAASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

RIM 2003 A 000053

REG.

NUMERO BREVETTO

DATA DI DEPOSITO

10/10/2003

DATA DI RILASCIO

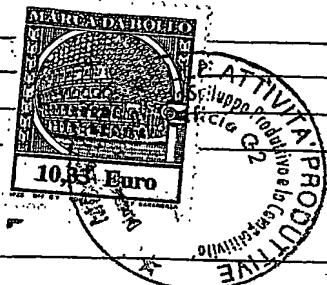
10/10/2003

D. TITOLO

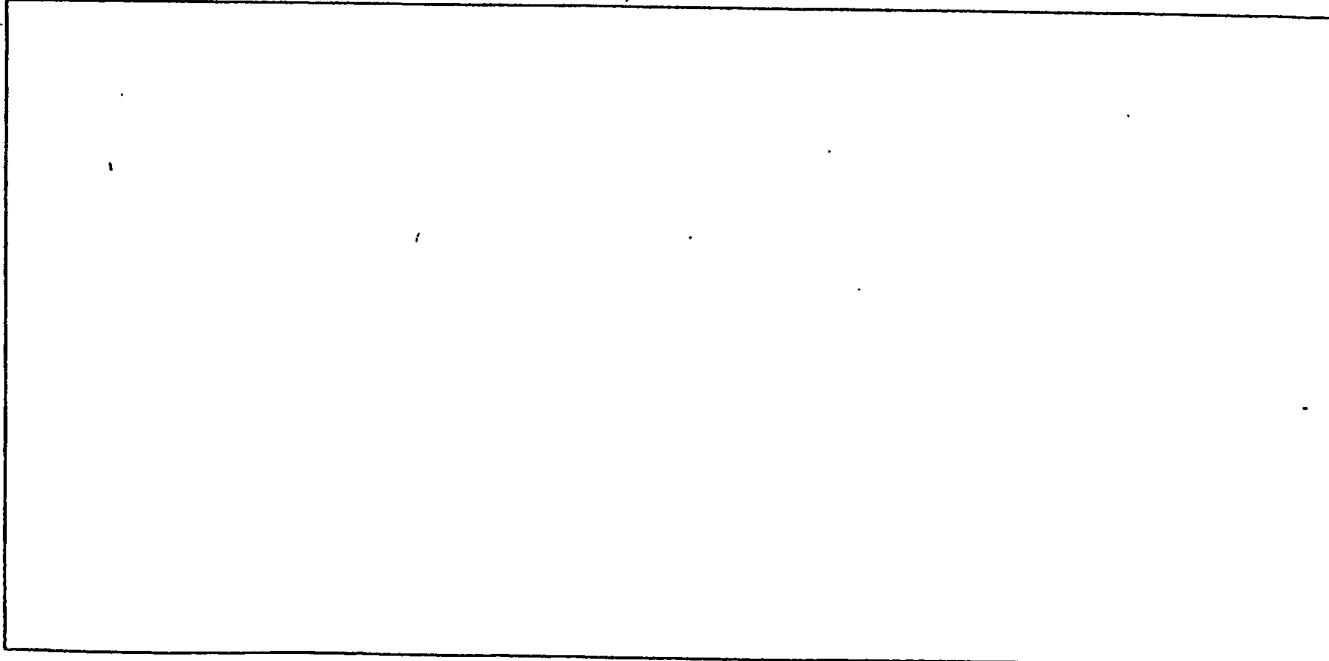
"Associazione di farmaci antidiabetici"

L. RIASSUNTO

Si descrive l'associazione tra R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)- ammino butirrato e metformina. Detta associazione di farmaci antidiabetici svolge un'azione sinergica e permette la somministrazione dei due farmaci a dosi tali da evitare o ridurre l'insorgere di effetti collaterali. L'associazione è anche utile per migliorare la copertura terapeutica lontano dai pasti, nel post- assorbimento e nel digiuno.



M. DISEGNO



RM 2003 A 000053

Descrizione dell'invenzione avente per titolo:

"Associazione di farmaci antidiabetici"

a nome: SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche

Riunite S.p.A.

di nazionalità: italiana

con sede in: Viale Shakespeare, 47 - 00144 Roma RM

Inventori: Pompeo PESSOTTO

Fabio GIANNESI

---000---

La presente invenzione si riferisce alla preparazione di medicamenti, in particolare per il trattamento del diabete, e più in particolare ad associazioni di principi attivi con effetto sinergico nei confronti di tale malattia.

Sfondo dell'invenzione

Il diabete è una malattia largamente diffusa e, secondo l'OMS, ha raggiunto in alcuni casi le proporzioni di un'epidemia.

E' attualmente la quarta principale causa di morte nei paesi industrializzati ed è in rapido aumento nei paesi in via di sviluppo.

Le stime sull'incidenza del diabete nel mondo sono aumentate dai 30 milioni di pazienti del 1985 ai 135 milioni del 1995, con una previsione di 240 milioni per l'anno 2010 e di 300 milioni per l'anno 2025.

Sono note diverse forme cliniche della malattia diabetica e le più comuni sono il diabete di tipo 1 e il diabete tipo 2.

Il diabete di tipo 1 è causato dalla distruzione autoimmune delle isole pancreatiche, che porta alla deficienza della secrezione d'insulina. In Europa e in Nord America, il diabete di tipo 1 è la terza più frequente malattia cronica dell'età giovanile.

Il diabete di tipo 2 è diffuso nei paesi dell'occidente, dove è più comune fra la popolazione anziana e obesa. L'incidenza del diabete di tipo 2 è stimata intorno al 5% della popolazione, con punte del 10-20% in alcune comunità. I più alti tassi di incremento del diabete di tipo 2 sono presenti nei paesi in via di sviluppo o loro comunità, dove un aumento degli standard di vita è associato all'adozione dello stile di vita occidentale e alla modernizzazione socio-economica. In condizione estreme, la malattia può riguardare anche oltre il 30% della popolazione.

Il diabete di tipo 2 interessa l'85% dei casi di diabete. E' un disordine multifattoriale, con componenti genetiche ed ambientali.

I progressi nella comprensione delle cause genetiche della malattia sono lenti a causa della sua eterogeneità e dell'interazione con fattori ambientali. Tuttavia, l'analisi dei geni candidati costituisce un seguito approccio ed una linea guida della ricerca in questo campo.

A parte l'età, l'insorgenza della malattia è favorita dal tipo di alimentazione, dalla mancanza di esercizio fisico e soprattutto dall'obesità, cui è ricollegabile l'85-90% dei casi.

In paesi come gli Stati Uniti d'America, dove il 30% della popolazione è obesa o in sovrappeso, l'incidenza del diabete di tipo

2 è del 7%, invece in Giappone, dove l'obesità è rara, è stata stimata un'incidenza dell'1%. L'incidenza è destinata ad allargarsi in proporzione all'allungarsi della durata della vita e alla crescita del benessere della popolazione.

Il diabete di tipo 2 è caratterizzato dalla iperglicemia, la quale è causata dalla deficienza di insulina e dall'insulino resistenza. È tuttora dibattuto fra gli studiosi se lo stadio iniziale nella patogenesi della malattia sia costituito dalla deficienza di insulina o dall'insulino resistenza. Generalmente, l'insulino resistenza è considerata il difetto primario del diabete di tipo 2, costituendo l'anello di collegamento fra l'obesità e la patologia. Secondo un'ipotesi sviluppata soprattutto in questi ultimi anni e basata su tecniche di clamp, l'insulino resistenza e il difetto delle cellule β sarebbero causate da un aumento del rilascio degli acidi grassi e da una sovraesposizione ad essi dei tessuti.

Il diabete è associato ad importanti complicanze cliniche, che includono il danno macrovascolare (aterosclerosi, infarto del miocardio, danno periferico delle arterie) e microvascolare (retinopatia, nefropatia e neuropatia). Le complicanze tardive del diabete sono una caratteristica inevitabile della malattia e una pesante minaccia al benessere e alla normalità di vita dell'individuo.

Il rischio di danno coronarico che rappresenta la causa di morte del 30-40% dei pazienti al di sopra dei 40 anni è tre volte più elevato negli uomini e donne con diabete che nei soggetti normali (*UK Prospective Diabetes Study, UKPDS 1976-1997*).



Stato dell'arte

La terapia della malattia diabetica ha come obiettivo primario la riduzione dei livelli di iperglicemia e il controllo glicemico.

Attualmente, per il trattamento del diabete di tipo 2 sono disponibili sul mercato farmaci di vecchia data, come la metformina e le sulfoniluree, e farmaci di recente introduzione come gli inibitori della α -glucosidasi e i tiazolidindioni. Come si può capire, le strategie che mirano al controllo dell'omeostasi del glucosio nel diabete di tipo 2 sono tra loro diverse e corrispondono alle diverse anomalie presenti nella patologia diabetica.

Le sulfoniluree promuovono la secrezione di insulina da parte delle cellule β e sono in grado di aumentare il rilascio acuto di insulina, che difetta nel diabete di tipo 2, e di migliorare quindi il controllo del glucosio post prandiale.

L'ipoglicemia è l'effetto collaterale più comune delle sulfoniluree e può essere severa e prolungata. Le sulfoniluree inoltre possono impedire la vasodilatazione nel cuore in caso di ischemia e talvolta dare aritmia.

Le biguanidi sono state introdotte nel mercato a partire dagli anni '50 e la più nota tra esse è la metformina, della quale si parlerà in dettaglio in seguito, nell'ambito del problema tecnico risolto dalla presente invenzione.

Gli inibitori dell' α -glucosidasi come l'acarbose e il voglibosio mirano a risolvere il problema dell'iperglicemia post prandiale, ral-

lentando l'assorbimento dei carboidrati nell'intestino. Queste sostanze sono inibitori competitivi dell' α -glucosidasi gastrointestinale, enzima che scinde l'amido e il saccarosio in monosaccharidi. Come la metformina, e diversamente dalle sulfoniluree, non causano ipoglicemia e aumento di peso. Gli inibitori dell' α -glucosidasi richiedono un aggiustamento della dose per i singoli pazienti ed è necessario che la dose sia abbastanza alta da rallentare la digestione nell'intestino tenue, ma anche abbastanza bassa da assicurare che la digestione sia completa prima dell'entrata dei carboidrati nell'intestino crasso (per evitare gli effetti collaterali intestinali). Il maggior effetto collaterale riportato è la flatulenza (19%), seguito dalla diarrea (3,8%). Gli inibitori dell' α -glucosidasi non alleviano la produzione epatica di glucosio che è attiva lontano dai pasti, nel post assorbimento e nel digiuno.

I tiazolidindioni (troglitazone, pioglitazone e rosiglitazone) sono ipoglicemizzanti orali da poco tempo entrati nel mercato con notevole successo. Nel 1998 il troglitazone (Rezulin) ha fatturato negli Stati Uniti d'America 748 milioni di dollari, una cifra di poco inferiore al fatturato della metformina (Glucophage) che è stato di 861 milioni di dollari, che quindi si colloca al primo posto fra gli antidiabetici orali nel mercato americano. I tiazolidindioni aumentano la sensibilità dei tessuti per l'insulina. Sono in grado di ridurre l'iperglicemia e in parte l'iperlipidemia diabetica e di ridurre i livelli di insulina. E' stato osservato che i composti sono agonisti del PPAR γ , un recettore nucleare presente soprattutto nel tessuto

adiposo, e inducono la trascrizione di geni controllati dall'insulina, come la lipoproteinlipasi (LPL). L'effetto ipoglicemizzante dei composti è forse secondario alla loro attività di reclutamento degli acidi grassi e dei trigliceridi dal circolo e alla produzione di adipocitochine, senza tuttavia poter escludere che i composti abbiano un'azione diretta sul tessuto muscolare. I composti sono infatti in grado di migliorare la cattura e il trasporto del glucosio nel muscolo in vivo e in vitro. L'effetto collaterale temuto di questi composti è il danno al fegato fino all'insufficienza epatica. Questi composti comportano inoltre un aumento del peso, ritenzione dei liquidi, anemia per diluizione del volume del plasma, e altri svariati effetti collaterali.

Pertanto, sulfoniluree, biguanidi, inibitori dell' α -glucosidasi e tiazolidindioni rappresentano le classi di farmaci oggi sul mercato per il controllo del glucosio nel diabete di tipo 2.

È evidente agli esperti del settore che, nonostante l'importante sforzo di ricerca di efficaci terapie del diabete, non è ancora disponibile un principio attivo in grado di impedire a lungo termine l'evoluzione della malattia. Pertanto, allo stato attuale delle conoscenze ogni monoterapia è nel tempo destinata a fallire, rendendo necessaria un'associazione. L'associazione è talvolta richiesta fin dall'inizio in mancanza di una risposta adeguata alla monoterapia.

Per quanto riguarda la metformina, essa fu introdotta in Europa negli anni '50 e negli Stati Uniti d'America nel 1994 ed è

largamente diffusa nel trattamento del diabete di tipo 2 ed è il farmaco di elezione nella terapia del diabete di tipo 2 associato all'obesità. La metformina riduce l'assorbimento intestinale del glucosio, la sua produzione epatica (*Cusi e De Fronzo, Diabetes Rev.*, 6: 89-131, 1998; *Hundal et al., Diabetes*, 49: 2063-2069, 2000) e ne migliora il trasporto e l'utilizzo nei tessuti, promuovendone la cattura nel muscolo, quando stimolato da insulina (*Galuska et al., Diabetologia*, 37: 826-832, 1994; *Bailey et al., New England J. Med.*, 334: 574-579, 1996). La sua azione riguarda anche il metabolismo dei lipidi attraverso la riduzione dei livelli degli acidi grassi liberi e dei trigliceridi nel sangue (*Cusi et al., J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 81: 4059-4067, 1996; *Kim et al., Diabetes*, 51: 443-448, 2002). La metformina inoltre, sarebbe in grado di restaurare la secrezione dell'insulina alterata dalla esposizione cronica agli acidi grassi o ad elevati livelli di glucosio (*Patanè et al., Diabetes*, 49: 735-740, 2000) e di inibire la lipasi del tessuto adiposo stimolata da catecolamine (*Flechtner-Mors et al., Diabetes Med.*, 16: 1000-1006, 1999). Non è ancora del tutto spiegato in modo soddisfacente il meccanismo della sua azione ipoglicemizzante e i siti molecolari di azione della metformina rimangono ancora poco chiari (*Wiernsperger e Bailey, Drug*, 58: 31-39, 1999; *Hundal et al., Diabetes*, 49: 2063-2069, 2000 ; *Musi et al., Diabetes*, 51: 2074-2081, 2002; *Hawley et al, Diabetes*, 51: 2420-2425, 2002). Sembra che la riduzione della produzione epatica di glucosio da parte della metformina sia legata alla diminuzione dei livelli di enzimi chiave



della gluconeogenesi come la glucosio-6-fosfatasi, la fosfoenolpiruvato carbossichinasi (PEPCK), la fruttosio-1,6-bifosfatasi (*Fulgencio et al., Biochem. Pharmacol., 62: 439-446, 2001; Song et al., Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab., 281: E275-E282, 2001*) e in parte sia mediata dalla soppressione dell'ossidazione degli acidi grassi (*Perriello et al., Diabetes, 43: 920-928, 1994*). Resta comunque provato che, a parte le lacunose conoscenze sui suoi meccanismi e processi, la metformina è in grado di migliorare l'utilizzo del glucosio e il profilo lipidico, riducendo quindi l'insulino resistenza (*Bailey, Diabetes Care, 15: 755-742, 1992; Cusi and De Fronzo, Diabetes Rev., 6: 89-131, 1998*). E' quanto risulta anche da un recente confronto della metformina con i moderni tiazolidindioni (*Kim et al., Diabetes, 51: 443-448, 2002; Ciaraldi et al., 51: 30-36, Diabetes, 2002*). Migliorando il profilo lipidico la metformina riduce di conseguenza il rischio cardiovascolare, in particolare l'incidenza dell'infarto del miocardio, come dimostrato dallo studio UKPDS di comparazione della metformina con le sulfoniluree e con l'insulina (*UKPDS Group, Lancet 352: 837-853, 1998*), e riduce anche la mortalità totale nei pazienti diabetici obesi (*O'Connor et al., J. Fam. Pract. 47 Suppl 5: S13-S22, 1998*). Questo aspetto che riguarda il miglioramento del profilo lipidico è irrinunciabile, visto che la dislipidemia nel diabete aumenta il rischio di danno cardiovascolare, la quale riguarda oltre il 50% dei pazienti diabetici (*Wilson et al., Drug Aging, 58: 248-251, 2001*). La metformina riduce l'iperglicemia del 20% (intervallo 13-37%),

quando usata come monoterapia dopo il fallimento della dieta e dell'esercizio fisico (*UKPDS II, Diabetes, 34: 793-798, 1985; De Fronzo et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 73: 1294-1301, 1991; Ciaraldi et al., Diabetes, 51: 30-36, 2002*), e del 25% in combinazione con le sulfoniluree (*Reaven et al., J. Clin. Endocrinol. Metab., 74: 1020-1026, 1992*).

L'azione della metformina ha tuttavia dei limiti e quindi può essere migliorata. La terapia con la metformina è limitata dal declino nel tempo della sua efficacia (*Guay, Pharmacotherapy, 18: 1095-1204, 1998; Riddle, Am. J. Med., 108 Suppl. 6a: S15-S22, 2000; Charpentier, Diab. Metab. Res. Rev., 18 Suppl. 3: S70-S76, 2002*).

A questo problema si accompagna anche l'acidosi lattica, che rappresenta l'effetto collaterale più importante. Inoltre, si possono avere diarrea, nausea e disturbi gastrointestinali, che hanno un'incidenza elevata (circa 20%) e ne riducono l'accettazione da parte del paziente.

Condizioni di sofferenza renale, di disfunzione epatica e di insufficienza cardiaca accrescono il rischio della acidosi lattica (*Krentz, Drug Saf., 11: 223-241, 1994*), per il pericolo di un aumento eccessivo dei livelli della metformina nell'organismo (*Jennings, Drug Aging, 10: 323-331, 1997*).

La terapia con metformina è comunque fondamentale anche se rimane ancora insoluta la questione del suo progressivo fallimento in regime di monoterapia e dei suoi effetti collaterali.

L'R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)-amminobutirrato (di seguito denominato anche ST1326) è un inibitore reversibile e selettivo della CPT1 epatica, in grado di allentare la spinta che l'ossidazione degli acidi grassi determina sulla gluconeogenesi. L'ossidazione epatica degli acidi grassi favorisce il processo della gluconeogenesi, stimolando la piruvico carbossilasi con l'aumento dei livelli di acetilCoA e facilitando i processi citosolici di sintesi del glucosio con l'abbondanza di ATP ed un elevato rapporto NADH/NAD⁺. Questo composto, descritto in WO 99/59957, a nome della richiedente, si distingue dagli inibitori irreversibili e non selettivi come l'etomoxir che hanno mostrato causare ipertrofia cardiaca (*Lesniak et al., Mol. Cell. Biochem., 142: 25-34, 1995; Vetter et al., Eur. Heart. J., 16 Suppl C: 15-19, 1995*). L'attività antidiabetica del composto, legata all'ossidazione degli acidi grassi, riguarda in particolare il periodo del post-assorbimento e del digiuno.

La produzione epatica di glucosio, alterata fin dall'inizio dalla patogenesi del diabete (*Osei, Diabetes, 39: 597-601, 1990*) aumenta fortemente durante la progressione della malattia, alimentando l'iperglicemia del diabete conclamato (*De Fronzo et al., Diabetes Care, 15: 318-368, 1992*), la quale è sostenuta dall'aumento dell'ossidazione degli acidi grassi (*Golay et al., Metabolism, 36: 692-696, 1987*) ed è favorita dalla caduta dei livelli di insulina e dalla insulino resistenza epatica (*De Fronzo et al., Metabolism, 38: 387-395, 1989*).

La combinazione dei farmaci nella terapia del diabete sopra ricordata è innanzitutto motivata dalla complessità della malattia, che riguarda più processi e più organi; forse proprio per questo in una percentuale di pazienti non è raggiungibile un buon controllo della malattia con i farmaci che sono oggi a disposizione (Rutten, *Ned. Tijdschr. Geneeskde.*, 145: 1547-1550, 2001). Nei pazienti diabetici inoltre, la monoterapia orale che inizialmente appare efficace è purtroppo associata ad un'alta percentuale di fallimento secondario ("secondary failure") (Brown *et al.*, *Clin. Ther.*, 21: 1678-1687, 1999; Riddle, *Am. J. Med.*, 108 Suppl. 6a: S15-S22, 2000). Non è poi insolito, nei pazienti con elevati livelli di glucosio ematico al tempo dell'inizio della monoterapia, un fallimento primario ("primary failure") (Charpentier, *Diabetes Metab. Res. Rev.*, 18 Suppl3: S70-S76, 2002). E' così che trova sempre più consenso l'idea di un'associazione di farmaci fin dall'inizio del trattamento farmacologico (Charpentier, *Diab. Metab. Res. Rev.*, 18 Suppl3: S70-S76, 2002).

Ancor oggi, tuttavia, dopo l'insuccesso della dieta e dell'esercizio fisico, la cura del diabete inizia quasi sempre con la monoterapia e solo successivamente quando il controllo glicemico è scarso e la monoterapia è insufficiente, si fa ricorso alla combinazione dei farmaci associando un secondo e talvolta un terzo farmaco: ad esempio metformina e sulfoniluree (Riddle, *Am. J. Med.*, 108 Suppl. 6a: S15-S22, 2000), i derivati della meglitinide e/o i tiazolidindioni e la metformina, e altri tipi di combinazione.

Oltre alla complessità della malattia e all'insuccesso della monoterapia, l'associazione è motivata dalla ricerca di un'efficacia maggiore (effetto additivo e/o sinergico) e dalla possibilità di riduzione degli effetti collaterali legata all'utilizzo di dosi minori.

È noto agli esperti del settore che l'effetto sinergico non è prevedibile a priori.

Riassunto dell'invenzione

È stato ora sorprendentemente trovato che l'associazione di R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)-ammino butirrato (ST1326) e metformina, riesce efficacemente a migliorare il controllo glicemico lungo tutto l'arco delle 24 ore, specialmente lontano dai pasti, nel post assorbimento e nel digiuno.

Pertanto, è un oggetto della presente invenzione l'associazione tra R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)-ammino butirrato o di un suo sale farmaceuticamente accettabile e metformina o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, come pure l'uso di detta associazione come medicamento, in particolare per la preparazione di un farmaco antidiabetico per il trattamento del diabete di tipo 2. Detto farmaco è utile per il controllo glicemico nell'arco delle 24 ore e in particolare nel periodo lontano dai pasti, in particolare nel periodo notturno, nel post-assorbimento e nel digiuno. È un ulteriore oggetto della presente invenzione fornire un medicamento per il trattamento del diabete che presenti effetti collaterali in misura sostanzialmente ridotta o assenti e inoltre possa essere utilizzato in pazienti per i quali è controindicata o



sconsigliata la metformina, ad esempio quelli affetti o rispettivamente a rischio di una o più complicanze tra danno renale, insufficienza cardiaca, danno epatico cronico, proteinuria clinica, danno vascolare periferico o danno polmonare.

La presente invenzione ha per oggetto anche una composizione farmaceutica che comprende detta associazione.

L'associazione secondo la presente invenzione ha rivelato un sorprendente sinergismo, che consente di fornire un'efficace terapia antidiabetica utilizzando dosi subfarmacologiche dei rispettivi componenti, con evidente vantaggio per il paziente in termini di indice terapeutico, in particolare in termini di effetti collaterali, di cui l'associazione ne è sostanzialmente priva o li presenta in termini ridotti. Se desiderato, è comunque possibile, e previsto dalla presente invenzione, l'utilizzo dell'associazione comprendente dosi farmacologiche di R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbam-moil)-ammino butirrato o di un suo sale farmaceuticamente accettabile e dosi subfarmacologiche di metformina o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, o viceversa.

Il summenzionato WO 99/59957 descrive il composto ST1326 e i suoi sali farmaceuticamente accettabili, la sua preparazione e l'attività farmacologica. In tale riferimento viene genericamente menzionata la possibilità di associazione di ST1326 con altri farmaci antidiabetici, tra i quali la metformina, ma non si fa il minimo cenno al problema tecnico affrontato e risolto dalla presente invenzione, in particolare alla riduzione o scomparsa degli effet-

ti collaterali della metformina, nè tanto meno all'effetto sinergico dell'associazione e nemmeno al miglioramento della copertura terapeutica totale del paziente diabetico.

La presente invenzione sarà ora esposta in dettaglio anche per mezzo di esempi.

Descrizione dettagliata dell'invenzione.

Alla luce di quanto discusso sopra, l'associazione risponde alla necessità di dover ricorrere ad un secondo farmaco quando la monoterapia non abbia più successo.

L'associazione dell'ST1326 con la metformina è supportata dall'aumento dell'attività che avviene secondo un meccanismo sinergico come mostrato negli Esempi che seguono. Entrambi i composti infatti sono interessati alla gluconeogenesi, ma si riferiscono a processi e ad attività enzimatiche diverse: nel caso della metformina il target sembrano essere gli enzimi della gluconeogenesi, invece nel caso dell'ST1326 il target è la CPT1 del processo di trasporto e di ossidazione degli acidi grassi. Questa differenza di azione non permetteva di prevedere il sinergismo di azione, soprattutto in termini di dosaggi, della combinazione della presente invenzione.

Per quanto i presenti inventori non desiderino essere legati ad alcuna teoria, dall'analisi dei risultati si potrebbe ipotizzare a posteriori che il sinergismo è dovuto probabilmente a quell'aspetto dell'azione della metformina che riguarda la sensibilità all'insulina e che è collegato al miglioramento del quadro lipidico. E' possibile

infatti che l'attività dell'ST1326, rivolta a ridurre l'ossidazione degli acidi grassi ed a diminuire per questa via la produzione epatica di glucosio, sia condizionata e contrastata dagli ormoni controregolatori (glucagone, GH, corticosterone) che operano in favore della lipolisi e della gluconeogenesi (*Fery et al., Am. J. Physiol., 270: E822-E830, 1996*). L'attività controregolatoria è tuttavia a sua volta condizionata dall'insulina, e quindi dalla sensibilità all'insulina: in definitiva la maggiore sensibilità all'insulina che deriva dall'azione della metformina "permette" che l'attività dell'ST1326 si possa esprimere nell'associazione con effetti superiori a quelli del solo ST1326. Questa ipotesi, tuttavia, non era formulabile in base alle conoscenze disponibili all'esperto del settore. In altre parole, i presenti inventori hanno osservato che, a motivo del miglioramento della sensibilità all'insulina, la risposta controregolatoria è in parte repressa, e l'azione inibitoria dell'ST1326 sull'ossidazione degli acidi grassi e sulla gluconeogenesi prende forza, non essendo più competitivamente contrastata.

Il sinergismo permette perciò di poter usare più basse dosi e conseguentemente gli effetti collaterali dei singoli composti possono essere ridotti o annullati.

In particolare abbassando la dose di impiego della metformina potrebbero scendere di importanza le condizioni di controindicazione e di cautela al suo impiego, come il danno renale, l'insufficienza cardiaca, il danno epatico cronico, la proteinuria clinica, il danno vascolare periferico, il danno polmonare, ecc.



L'incidenza di questi disordini è tutt'altro che rara. Secondo l'analisi retrospettiva di uno studio su pazienti di una clinica universitaria per diabetici del Regno Unito, l'incidenza di condizioni considerate come controindicazioni o fattori di rischio all'uso della metformina sarebbe circa del 54% (*Sulkin et al., Diabetes Care, 20: 925-928, 1997*).

Ancora, secondo uno studio retrospettivo su pazienti in Scozia che utilizzavano la metformina nel periodo gennaio 1993 – giugno 1995, il 24,5% aveva controindicazioni al suo uso (*Emslie-Smith et al., Diabet Med, 18: 483-488, 2001*).

Infine analizzando il caso di 306 pazienti trattati con la metformina, prima come pazienti a domicilio e poi ammessi in un ospedale generico in Germania nel periodo gennaio 1995 – maggio 1998, a causa di un danno acuto o per ottimizzazione del loro trattamento, è stato trovato che, al momento della loro accettazione all'ospedale, il 73% aveva controindicazioni, fattori di rischio o malattie intercorrenti che necessitavano l'interruzione della metformina (*Holstein et al., Diabet. Med., 16: 692-696, 1999*).

Concludendo, anche se l'acidosi lattica rimane un caso raro (*Howlett and Bailey, Drug. Saf., 20: 489-503, 1999*), abbassando la dose di trattamento mediante l'associazione con l'ST1326 potrebbero scendere di importanza le condizioni di controindicazione e di cautela all'uso della metformina, che sono considerevoli durante la progressione della patologia.

Vantaggi analoghi di minori effetti collaterali si possono avere per le stesse ragioni rispetto all'uso di ST1326 in monoterapia.

I potenziali effetti indesiderati del solo ST1326, al momento ipotizzabili in base agli effetti del composto nel ratto e nel topo, possono essere costituiti da un aumento degli acidi grassi nel sangue e dal deposito dei lipidi nel fegato.

I dati ottenuti nella scimmia tuttavia evidenziano che tali effetti possono essere legati al modello di metabolismo del roditore e quindi non sono riproducibili allo stesso modo in altre specie più vicine all'uomo.

Per quanto riguarda gli aspetti connessi all'applicabilità industriale, l'associazione secondo la presente invenzione potrà essere convenientemente formulata in una composizione farmaceutica. Tale composizione può essere una semplice combinazione di forme farmaceutiche note dei singoli principi attivi, il cui dosaggio sarà stabilito secondo le modalità derivanti dall'applicazione dell'insegnamento della presente invenzione, vale a dire dosi ridotte tali da assicurare il reciproco sinergismo e, se desiderato, la riduzione o scomparsa degli effetti collaterali, in particolare della metformina. In tal caso, la composizione secondo la presente invenzione può essere anche sotto forma di kit, ossia una confezione che raggruppa le singole forme di dosaggio dei principi attivi e le istruzioni per la loro somministrazione contemporanea o sequenziale. In alternativa, la presente invenzione fornisce una nuova compo-

sizione farmaceutica comprendente i due principi attivi in una unica forma di dosaggio. Vantaggiosamente, tale forma di dosaggio conterrà quantità efficaci di principi attivi tali da fornire una copertura terapeutica con un numero minimo di somministrazioni giornaliere. In una forma preferita di realizzazione, la composizione farmaceutica conterrà anche una unità di dosaggio tale da assicurare la copertura nel periodo di digiuno notturno.

Le dosi e le modalità di somministrazione saranno stabilite dall'esperto del settore, ad esempio il clinico o il medico curante, ricorrendo alle proprie conoscenze generali. Un esempio preferito di dosaggio prevede per il R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)-ammino butirrato una dose compresa fra 10 mg e 1 g o una dose equivalente di un suo sale farmaceuticamente accettabile, mentre per la metformina è previsto un intervallo compreso fra 50 mg e 2,5 g o una dose equivalente di un suo sale farmaceuticamente accettabile.

Le composizioni farmaceutiche secondo la presente invenzione sono del tutto convenzionali e non necessitano di alcuna particolare descrizione. Ad ogni modo, una descrizione di composizioni farmaceutiche si trova nel summenzionato WO 99/59957 e, in maggior dettaglio in Remington's Pharmaceutical Sciences, ultima edizione, Mack Publishing and Co.

Il seguente esempio illustra ulteriormente l'invenzione.

Esempio

Sinergismo dell'attività ipoglicemizzante dell' ST1326 e della Metformina nel topo ob/ob, db/db e C57BL/6 a dieta grassa.

Mutazioni negli animali da laboratorio hanno permesso di sviluppare dei modelli che presentano il diabete non insulino dipendente associato all'obesità, all'iperlipidemia e all'insulino resistenza e che permettono di testare l'efficacia di nuovi composti antidiabetici (*Reed and Scribner, Diabetes, Obesity And Metabolism, 1: 75- 86, 1999*).

Modelli di topo geneticamente diabetico largamente utilizzati sono il topo ob/ob e il topo db/db. La base genetica di questi modelli è un difetto nel gene della leptina (topo ob/ob) o del recettore della leptina (topo db/db), che determina leptino-resistenza e comporta iperfagia, obesità, iperinsulinemia e insulino resistenza, con conseguente iperglicemia. (*Hummel et al., Science 153: 1127-1128, 1996; Coleman, Diabetologia 14: 141-148, 1978; Kodama et al., Diabetologia 37: 739 - 744, 1994; Zhang et al., Nature 372: 425-432, 1994; Halaas et al., Science 269: 543-546, 1995; Chen et al., Cell 84: 491 - 495, 1996*).

Poiché l'iperglicemia è accompagnata da obesità e insulino resistenza, i topi ob/ob e db/db hanno caratteristiche che li avvicinano al diabete di tipo 2 dell'uomo.

Oltre ai modelli genetici di diabete, è frequente l'uso di modelli che comprendono fattori ambientali come il tipo di dieta, per l'importanza che essi rivestono nella patogenesi del diabete.

Un esempio è il topo C57BL/6, che, per esposizione a dieta grassa, non solo sviluppa insulino resistenza ma anche una modesta iperglicemia (*Surwit et al., 37: 1163-1167, 1988; Luo et al., Metabolism 47: 663-668, 1998*).

I topi B6. V-Lep ob/ob, C57BL/KsJ db/db e C57BL/6 degli esperimenti vennero forniti dalla Jackson Lab. (tramite Charles River).

La dose di ST1326 da utilizzare nell'associazione dell'ST1326 con la Metformina venne ricavata da esperimenti precedenti, che indicavano come efficace nell'abbassare la glicemia del topo db/db la dose di 100 mg/Kg/die e come inattiva la dose di 40 mg/Kg/die (Tabella 1).

La dose di Metformina da utilizzare è stata ricavata da dati della letteratura (*Meglasson et al., J. Pharmacol. Exp. Ther. 266: 1454-1462, 1993*) che indicavano la dose di 900 mg/Kg/die come efficace nel ridurre del 50% l'iperglicemia del topo KKAY, un modello di diabete genetico, obeso, iperinsulinemico e iperglicemico simile al topo db/db e ob/ob, mentre la dose di 200 mg/kg/die era inefficace, oltre che da nostri esperimenti precedenti che indicavano la dose di 600 mg/Kg/die (Tabella 2) come efficace nel ridurre del 22% l'iperglicemia del topo ob/ob al test dell'IST, mentre è noto che il farmaco è inefficace alla dose di 200 mg/kg/die.

Ai topi ob/ob e db/db in condizioni ambientali standard, a dieta normale (4 RF21, Mucedola) e ai topi C57BL/6J a dieta grassa (D-12331, Research Diets) da 3 mesi, è stato prelevato il



sangue in condizioni di post-assorbimento (digiuno ore 8,30 - 16,30 dalla vena caudale, con l'aiuto di un catetere Jelco 22G (Johnson and Johnson).

Nel sangue sono stati controllati i livelli di glucosio per un'omogenea distribuzione dei topi nei gruppi di trattamento.

All'inizio del trattamento è stato controllato il peso corpo degli animali e predisposto il monitoraggio del consumo di acqua e mangime.

I topi sono stati trattati due volte al giorno (ore 8,30 e 18,30), per via orale con l'ST1326 alla dose di 30 mg/Kg e con la Metformina alla dose di 200 mg/Kg, da soli o in associazione.

A vari giorni dalla somministrazione dei prodotti e in diverse condizioni nutrizionali è stato prelevato il sangue per la determinazione della glicemia, per il test OGTT (Oral Glucose Tolerance Test) e IST (Insulin Suppression Test: *Fujita et al., Diabetes 32: 804-810, 1983; Meglasson et al., J. Pharm. Exp. Therap. 266: 1454-1462, 1993; Luo et al., J. Pharm. Exp. Therap. 288: 529-534, 1999*).

Nel Test OGTT il sangue è stato prelevato a 0', 30', 60' e 120' dal carico di glucosio (3 g/kg).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che i singoli composti alle dosi sperimentali usate non hanno un'attività ipoglicemizzante significativa, mentre la loro associazione è in grado di abbassare significativamente l'iperglicemia con un'azione sinergica (Tabelle 3-8).

Nel Test IST il sangue è stato prelevato a 60' dal carico sottocutaneo di glucosio (3 g/Kg), insulina (Humulin R., Lilly 2U/Kg) e somatostatina (0,5 mg/Kg).

Tabella 1

TOPO DB/DB

Livelli di Glucosio (mg/dl) nel siero dei topi maschi db/db trattati con l'IST1326 o il veicolo (H₂O deionizzata) alla dose di 20 e 50 mg/Kg, per via orale, due volte al giorno (ore 8,30 e 17,30) per 45 giorni, in condizioni di post-assorbimento (digiuno dalle 8,00 alle 17,30) e a 8 ore dall'ultimo trattamento. (Valori medi ± E.S.)

Gruppi	Dose mg/Kg	Glucosio (mg/dl)	Glucosio db/db	
			576 ± 43	562 ± 40
CONTROLLO	--			
ST1326	20			
ST1326	50		350 ± 48 Δ	

numero dei casi per gruppo: 8.

Test 't' di Student: Δ indica P <0,01 vs il Controllo.

Tabella 2

TOPO OB/OB

Livelli di Glucosio (mg/dl) nel sangue dei topi maschi ob/db trattati per via orale con Metformina 300 mg/Kg o il veicolo (H₂O deionizzata) due volte al giorno (ore 8,30 e 18,30) per 8 giorni, al Test IST in condizioni di post-assorbimento (digiuno dalle 8,30 alle 16,30) e a 8 ore dall'ultimo trattamento. (Valori medi ± E.S.)

Gruppi	Dose mg/Kg	Glucosio mg/dl	Glucosio	
			527,4 ± 33,0	412,1 ± 35,5 □
CONTROLLO	--			
METFORMINA	300			

numero dei casi per gruppo: 6.

Test 't' di Student: □ indica P <0,05 vs il Controllo.

Tabella 3

TOPO OB/OB

Livelli di Glucosio (mg/dl) nel sangue dei topi maschi ob/ob trattati con l'ST1326 (30 mg/Kg) e la Metformina (200 mg/Kg), da soli o in associazione, due volte al giorno per 11 giorni, in condizioni di alimentazione e a 15 ore dall'ultimo trattamento. (Valori medi ± E.S.)

Gruppi	Dose	Glucosio
	mg/Kg	mg/dl
CONTROLLO	--	394,1 ± 32,9
ST1326	30	394,8 ± 25,7
METFORMINA	200	376,3 ± 20,4
ST1326 + METFORMINA	30 + 200	287,3 ± 18,7 ■

numero dei casi per gruppo: 6.

Test 't' di Student: ■ indica $P < 0,02$ vs Controllo.

Tabella 4

Livelli di Glucosio (mg/dl) nel sangue dei topi maschi ob/ob, trattati con l'ST1326 (30 mg/Kg) e la Metformina (200 mg/Kg), da soli o in associazione due volte al giorno, per 18 giorni, al test IST in condizioni di post-assorbimento (digiuno ore 8,30-16,30) e a 8 ore dall'ultimo trattamento. (Valori medi ± E.S.)

Gruppi	Dose	Glucosio
	mg/Kg	mg/dl
CONTROLLO	--	517,7 ± 48,7
ST1326	30	524,2 ± 56,2
METFORMINA	200	433,7 ± 34,8
ST1326 + METFORMINA	30 + 200	362,7 ± 39,2 □

numero dei casi per gruppo: 6.

Test 't' di Student: □ indica $P < 0,05$ vs Controllo.

Tabella 5

TOPO DB/DB

Livelli di Glucosio (mg/dl) nel sangue dei topi maschi db/db, trattati con l'ST1326 (30 mg/Kg) e la Metformina (200 mg/Kg), da soli o in associazione, due volte al giorno per 16 giorni, in condizioni di post-assorbimento (digiuno ore 9,00-15,00) e a 6 ore dall'ultimo trattamento. Valori medi \pm E.S.

Gruppi	Dose mg/Kg	Glucosio mg/dl	Glucosio			
			360,2 \pm 20,2	370,7 \pm 30,0	337,8 \pm 33,1	269,9 \pm 26,9 ■
CONTROLLO	--		360,2 \pm 20,2			
ST1326	30		370,7 \pm 30,0			
METFORMINA	200		337,8 \pm 33,1			
ST1326 + METFORMINA	30 + 200		269,9 \pm 26,9 ■			



numero dei casi per gruppo: 6.

Test 't' di Student: ■ indica $P < 0,02$ vs Controllo.

Tabella 6

Livelli di Glucosio (mg/dl) nel sangue dei topi maschi db/db, trattati con l'ST1326 (30 mg/Kg) e la Metformina (200 mg/Kg), da soli o in associazione, due volte al giorno per 37 giorni, al test OGTT in condizioni di digiuno (overnight) e a 15 ore dall'ultimo trattamento. (Valori medi \pm E.S.)

Gruppi	Dose mg/Kg	Glucosio mg/dl				AUC
		0'	30'	60'	120'	
CONTROLLO	--	247,2 \pm 30,4	577,8 \pm 24,5	503,0 \pm 34,8	361,0 \pm 40,7	54506 \pm 3760
ST1326	30	175,3 \pm 25,6	557,2 \pm 30,6	498,3 \pm 23,5	284,6 \pm 20,8	50308 \pm 2430
METFORMINA	200	195,5 \pm 21,5	530,9 \pm 34,6	456,8 \pm 52,4	344,4 \pm 40,9	49746 \pm 4720
ST1326 + METFOR.	30 + 200	58,4 \pm 19,9 ▲	255,4 \pm 81,4 Δ	332,4 \pm 84,9	256,1 \pm 39,8	31180 \pm 7557 ■

numero dei casi per gruppo: 6.

Test 't' di Student: ■, Δ e ▲ indicano rispettivamente $P < 0,02$, $P < 0,01$ e $P < 0,001$ vs Controllo.

Tabella 7

TOPO A DIETA GRASSA

Livelli di Glucosio (mg/dl) nel sangue dei topi maschi C57BL/6J a dieta grassa, trattati con L'ST1326 (30 mg/Kg) e la Metformina (200 mg/Kg), da soli o in associazione, due volte al giorno per 15 giorni, in condizioni di post-assorbimento (digiuno ore 9,00-15,00) e a 6 ore dall'ultimo trattamento.(Valori medi \pm E.S.)

Gruppi	Dose mg/Kg	Glucosio mg/dl
CONTROLLO a dieta grassa	--	168,5 \pm 12,3
ST1326	30	167,3 \pm 4,7
METFORMINA	200	146,1 \pm 9,2
ST1326 + METFORMINA	30 + 200	122,8 \pm 4,7 Δ
CONTROLLO a dieta standard	--	135,7 \pm 6,5 \square

numero dei casi per gruppo: 6.

Test t' di Student: \square e Δ indicano rispettivamente $P < 0,05$ e $P < 0,01$ vs Controllo a dieta grassa

Tabella 8

Livelli di Glucosio (mg/dl) nel sangue dei topi maschi C57BL/6 a dieta grassa, trattati con l'ST1326 (30 mg/Kg) e la Metformina (200 mg/Kg), da soli o in associazione, due volte al giorno per 35 giorni, al test OGTT, in condizioni di post-assorbimento (digiuno ore 9,00-15,00) e a 6 ore dall'ultimo trattamento. (Valori medi \pm E.S.)

Gruppi	Dose mg/Kg	Glucosio (mg/dl)				AUC
		0'	30'	60'	120'	
CONTR. a d. grassa	--	170,8 \pm 259,7 \pm 220,1 \pm 210,0 \pm				26554 \pm 1018
		12,4	11,1	6,9	12,2	
ST1326	30	156,0 \pm 236,3 \pm 207,0 \pm 212,9 \pm				25133 \pm 652
		7,8	11,2	9,9	8,6	
METFORMINA	200	141,1 \pm 241,2 \pm 212,3 \pm 186,2 \pm				24487 \pm 1182
		11,4	18,9	5,0	15,1	
ST1326 +	30+200	118,4 \pm 217,5 \pm 187,7 \pm 155,6 \pm				21414 \pm 387 Δ
METFOR.		6,3 Δ	5,6 Δ	2,9 Δ	6,9 Δ	
CONTR. a d.	--	121,1 \pm 200,5 \pm 187,0 \pm 159,0 \pm				21016 \pm 283 Δ
standard		4,4 Δ	6,2 \blacktriangle	3,3 Δ	4,1 Δ	

numero dei casi per gruppo: 6.

Test 't' di Student: Δ , \blacktriangle indicano rispettivamente $P < 0,01$ e $P < 0,001$ vs Controllo a dieta grassa.

28
RM 2003 A 000053

RIVENDICAZIONI

1. Associazione di R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbam-moil)-ammino butirrato o di un suo sale farmaceuticamente accettabile e metformina o di un suo sale farmaceuticamente accettabile.
2. Uso dell'associazione secondo la rivendicazione 1 come medicamento.
3. Uso dell'associazione secondo la rivendicazione 1 per la preparazione di un medicamento per il trattamento del diabete di tipo 2
4. Uso secondo la rivendicazione 3 per la preparazione di un medicamento ad attività antidiabetica per il controllo glicemico nell'arco delle 24 ore.
5. Uso secondo la rivendicazione 4, dove detto medicamento è utile per il controllo glicemico lontano dai pasti, nel post-assorbimento e nel digiuno.
6. Uso secondo una delle rivendicazioni 2-5 per la preparazione di un medicamento ad attività antidiabetica, detto medicamento essendo privo o avendo effetti collaterali tipici dei singoli componenti di detta associazione sostanzialmente ridotti.
7. Uso secondo la rivendicazione 6, dove detto medicamento è utilizzato per il trattamento di pazienti diabetici per i quali è controindicata o sconsigliata la metformina.
8. Uso secondo la rivendicazione 6 o 7, dove detto medicamento è indicato in pazienti affetti da una o più complicatezze tra danno



renale, insufficienza cardiaca, danno epatico cronico, proteinuria clinica, danno vascolare periferico o danno polmonare.

8. Composizione farmaceutica comprendente l'associazione della rivendicazione 1.

9. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 8, comprendente dosi subfarmacologiche di R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)-ammino butirrato o di un suo sale farmacologicamente accettabile e di metformina o di un suo sale farmacologicamente accettabile, rispettivamente.

10. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 8, comprendente dosi farmacologiche di R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)-ammino butirrato o di un suo sale farmacologicamente accettabile e dosi subfarmacologiche di metformina o di un suo sale farmacologicamente accettabile, rispettivamente.

11. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 8, comprendente dosi subfarmacologiche di R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)-ammino butirrato o di un suo sale farmacologicamente accettabile e dosi farmacologiche di metformina o di un suo sale farmacologicamente accettabile, rispettivamente.

12. Composizione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 8-11 comprendente R-4-trimetilammonio-3-(tetradecilcarbammoil)-ammino butirrato o un suo sale farmacologicamente accettabile e metformina o un suo sale farmacologicamente accettabile in una unica forma di dosaggio.

13. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 12, dove una unità di dosaggio è adatta alla copertura terapeutica del periodo del digiuno notturno.

14. Composizione farmaceutica secondo le rivendicazioni 8-13, in cui l'ST 1326 è presente ad una dose compresa tra 10 mg e 1 g o una dose equivalente di un suo sale farmaceuticamente accettabile, e la metformina è presente ad una dose compresa tra 50 mg e 2,5 g o una dose equivalente di un suo sale farmaceuticamente accettabile.

p.i. di SIGMA-TAU Industrie Farmaceutiche Riunite S.p.A.

Dott. Marco Spadaro

